(18) 日本日本日(1 b)

開特許公報(4) (E)

特開2002-128690

(11)物作出面公司每号

(P2002-128690A)

(43)公開日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(51) Int.CI.	CONTROL S	F.	(中央), (-C1-4	
A 6 1 K 38/	8	A61P 29	101	
A 6 1 P 29/00	101	88	35/00	
35/1	90	2	13/00	
1/83	96	A61K 37	17/02	
		P	(本本語の 事を記り (本 5 日)	

(71)出现人 588152747 広知 使成	東京都文成区内丘1-20-6-503 (72)発明者 広畑 像成 (74)代理人 100068700
N 112000-316464(P2000-316464)	平成12年10月17日(2000. 10. 17)
(21)出版路号	(22)H B H

(54) [58] ひむを アポトーツス 配辞を

【解決手段】 TNF-a及び1L-4を有効成分とす (57) [聚物]

るアポトーシス制導剤。

性関節リウマチ治療剤、自己免疫疾患治療剤、肝炎、肝 【効果】 本発明アポトーシス態等的は、TNF-a又 は1L-4を単独で用いた場合に比べ、アポトーシス略 導効果が相乗的に増強され、制作用の少ない制格剤、便 硬度等の肝疾患治療剤等として使用できる。

【糖求項1】 TNF-a及び1L-4を有効成分とす 5アボトーシス括導剤。

【精求項2】 悪性腫瘍又は慢性関節リウマチの予防

治療薬である請求項1配載のアポトーシス誘導剤。

[発明の詳細な説明] [1000]

[発明の属する技術分野] 本発明はアポトーシス誘導剤 に関するものである。

[0002]

【従来の技術】アポトーシスはプログラムされた細胞死 の一形態であり、古典的細胞死(ネクローシス)と対比 されるものである。アポトーシスは生理学上の種々の条 の接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの 活性に関連したクロマチンの凝縮及び核模線、核の分節 化、粗粒玻面の微絨毛の消失、粗粒玻面の平净化(粗粒 ック体細胞の最終断片が隣接する細胞により貧食される 件下に起こり、その形態学的特徴として、周囲の細胞と 被面の水疱形成:membrance blebbing)及びエンドヌヌ クレアーゼによるDNAの断片化が観察され、アポティ 数様として魅じられている (Dovall,E. and Wyllie,A.

H., Immunology Today, 7 (4), 115-119 (1986) : Sci ence, 245, 301-305 (1989) , 【0003】アポトーシスは正常な発生・分化に不可欠 な生理的細胞死であり、正常な生体組織の細胞回転など

る。例えば、ワタナペーフクナガらはMRLIpr/1 ガティブセレクション (アポトーシス) 機構がうまく作 3 (Watanabe-Fukunaga, R., et al., Nature, 356, 314 -317 (1992))。また、慢性肝炎が肝硬変、肝癌に移行 って、斯かる疾患に関与する細胞のアポトーシスを誘導 病、増殖性皮膚疾患、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患 その結果、細胞に機能障害が生じるものと考えられてい prマウスにおいては、アポトーシスに関与するFas 分子に異常があり、胸腺における自己反応性T細胞のネ 助せず、その結果自己免疫疾患が発症すると示唆してい していく過程では、アポトーシスは抑制状態にあり、こ 糠維化、肝硬変へと違庭するものと考えられている。従 れがサイトトキシックT細胞による肝細胞の炎症に続く 等の疾患においては、アポトーシスが過剰に抑制され、 する物質は、当眩疾患の予防・治療薬として有用であ

ミドやR N A 合成阻害剤であるアクチノマイシンD、理 キシン (LT) 等のサイトカイン製にアボトーシスの読 J. Emmunol., 145,1859-1867 (1990), Strelow, A., et al., J. Exp. Ned., 192. 601-611(2000))、また最近 【0004】従来、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシ 協議死因子(以下、「TNF-a」という)やリンホト 尊作用があることが報告され(Nartin,S.J.. et al..

特閒2002-128690

2

816(1992), J.Allergy Ciln. Jenunol., 102(6 Pt 1), 10 に、ヒト単球や好酸球に対してアポトーシス誘導作用が あることが報告されている (J.1maunol.,148(6),1812-1

アポトーシス酰導活性や副作用の点から充分なものでは なく、アポトーシス誘導活性が高く且つ安全性の高いア ポトーシス誘導剤が求められていた。 【0005】しかし、これまでに知られている物質は、 [0000]

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有効性が高 く且つ安全性の高いアポトーシス誘導剤を提供すること を目的とする。 [0000]

に鑑み、アポトーシス誘導活性を有する物質について鋭 象研究した結果、TNF-aと!L-4を併用した場合 に、未分化細胞や前隔体細胞に対してそれぞれが有する アポトーシス誘導効果が相乗的に増強され、アポトーシ スの過剰抑制に伴う疾患の予防・治療薬として有用であ 【課題を解決するための手段】本発明らは、斯かる契情 ることを見出し、本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、TNF-a及び1L - 4 を有効成分とするアポトーシス誘導剤を提供するも 07E5.

[0000]

TNFーαとILー4を右効成分とするものであるが、 ここで、TNFーαとは、炎症を通した生体防御機構を 中心に、抗腫瘍作用、吸骨作用、钼酸への脂質の取り込 み昭都作用、インターロイキン--やコロバー刺戯田子 の生産誘導作用等、多様な生物活性を示す分子の17ト Daのポリペプチドであり、1L-4とは、広い配田の 免疫苗間刺激作用(B 田間の形質細胞への分化、丁粗酸 の分化増強)を中心に、抗国協作用、「型アレルギー縣 導作用、抗炎症作用等を有するサイトカインの一種であ る。これらTNF-a及び1L-4には前述したように TNF-aとIL-4を併用した場合に、餃アポトーシ ス誘導効果が相乗的に増強されることは全く予例するこ アポトーシス誘導作用があることが報告されているが、 【発明の実施の形態】本発明のアポトーシス誘導的は、

【0010】本発明のアポトーシス酰導剤に用いられる 及びIL-4としての活性を有する、天然型収いは遺伝 子相換えにより産生された組換え体の向れもが包含され TNFーa及びILー4としては、それぞれTNFーa とができなったことである。

ウイルス (Sendal Virus) 刺激ヒトBリンパ芽球株BA ししー1などの既存の細胞株の培養上済より、アフィニ ティークロマトグラフィーやHPLCなどの既知方法に 従い精製することにより得ることができ、遺伝子の相換 【0011】天核型のTNF-aは、例えば、センダイ

えによって得られるTNF-aは、昭知の遺伝子を組み

ではインターロイキン4 (以下、「1L-4」という)

Ĺ

(1 ng/ml) を添加した伯地で監製し、TNFーα (10 ng/ml) 磁加、IL-4 (10ng/ml) 磁加、その両右 (10ng/ml+10ng/ml) を磁加叉は非磁加(対照屏)に 価値を0.1%TrltonX-100及び0.1%ク エン酸ナトリウムを含むPBS200μ1に浮遊し、P 4 ℃で 1 0 分)後フローサイトメーター(EPICS XL:Cou lter)にて映色陽性細胞(アポトーシス形細胞)を測定 した。結果を扱しに示す。尚、培地は、RPMI-16 00 unit/ml)、ストレプトマイシン (100 μg/ml)、 Lーグルタミン (0.3mg/ml) 及びFBS (10% fetalb ovine serum: Life Technologies社製)を添加して用い た。また、SCF (stem cell factor) 、GM-CSF

て2週間培養した。培養後、PBSにて細胞を洗浄し、

I 英色(10μg/ml Propidium lodideの10μ1を発加し

込んだプラスミド或いはベクターを導入した大脚菌や既 **序細胞株の魔生斑白を同様に捕製することにより得るこ**

【0012】また、天然の1Lー4は、ヒトT細胞クロ エン等で非刺散戦いは刺激した培養上清から回様に辞製 **ーンや状的血工価値吸いは任意の既存価髄株をマイトジ** して収得でき、組換え1L-4も既存遺伝子の利用によ って前記と周様にして得ることが可能である。

るものでもよい。また、TNF-aとIL-4の配合比 ことができ、特にTNF-aを30~10%、IL-4 nとILー4とが単一の製剤中に含まれるように顕製さ hてもよく、喰いは、TNF-aとIL-4のそれぞれ 中は、アポトーシス島導作用の相乗効果が発揮できれば 特に限定されずそれぞれ1~99%の範囲で混合される 【0013】本発明のアポトーシス誘導剤は、TNFー を別価の製剤として開製し、これら2つの製剤を併用す を10~30%で配合することが好ましい。

はしししょを日祖で用いた場合に比べ、アポトーツス原 従って、TNFーα又はIL-4を単独で投与する場合 【0014】このようにして間製された本発明のアポト ーシス精導剤は、復配取施例に示すようにTNFーa又 **導効果が若しく増強されるという相乗作用を発揮する。** に比べて両右の投与国を大幅に減少させることができ、 別作用の低減が可能となる。

【0015】本発明のアポトーシス制導剤の成人に対す TNFーaについては、歯椎一日当たり50g/body〜 5 0mg/body程度であり、IL-4については、一日当 たり50μg/body~50mg/body程度とするのがជまし る一日当たりの投与面は、広範囲に適宜選択されるが、

各種の投与形貌で使用される。斯かる製剤は、通常使用 される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、装面 活性剤、滑沢剤等の看釈剤或いは賦形剤を無導性素理担 刺、丝刺、注射剤(液剤、應調剤等)、点眼剤等が挙げ 【0016】本発明のアポトーシス誘導剤は、その使用 目的に応じ、医素製剤としてこの分野で慣用されている 体として用いて開製される。剤形は、治療目的に応じて 各種の形態が選択でき、この代表的なものとして錠剤、 丸剤、散剤、粧剤、腫瘍剤、乳剤、顆粒剤、カプセル

【0017】錠剤の形態に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば 乳箱、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプ **森体の異形型、犬、Hタノーガ、プロペノーガ、却ツロ** ップ、ファウ臨後、アンプン後、ガシチン溶液、カウボ リン酸カリウム、ボリピニルピロリドン糖の結合剤、乾 数ピンプン、ピラボン数ナトリウム、センドンボ、サミ ナラン末、収費水煮ナトリウム、収費カルシウム、ポリ **戦戦カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ キシメギルセルロース、カサック、メチルセルロース、**

一、水業街直油等の登録的制制、第4級アンモニウム協裁、ラウリル試像ナトリウム等の吸収配達剤、グリセリン、デンブン等の保留的、デンブン、乳糖、カオリン、、デンブン等の保留的、デンブン、乳糖、カオリン、 **スントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タル** ル等の滑沢剤等が例示できる。更に錠剤は必要に応じ適 オキシエチレンンルピタン脂肪酸エステル類、ラウリル ク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコー 硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンブ 常の利皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン桜包 ン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオパタ 錠、関溶核錠、フィルムコーティング錠あるいは二重 錠、多面錠とすることができる。

【0018】丸剤の形態に成形するに限しては、損体と カオリン、タルク等の賦形剤、アラピアゴム末、トラガ ント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン してこの分野で従来公知なるものを広く使用でき、例え ばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、 カンテン等の崩壊剤等が例示できる。

【0019】 坐剤の形態に成形するに際しては、担体と して従来公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレ ングリコール、カカオ間、高級アルコール、高級アルコ **一ルのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等を 挙げることができる。**

く、これら液粒、色色及び酸温粒の形態に成形するに軽 しては、希釈剤としてこの分野において慎用されている ロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコ 一心、ポリオキシ化インステアリルアルコール、ポリオ キシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げるこ とができる。尚、この場合等張性の溶液を顕製するに充 分な面の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを医素製剤 中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝 【0020】注射剤として調製される場合には、液剤及 び懸躍剤は殺菌され、 且つ血液と等張であるのが好まし ものを全て使用でき、例えば水、エチルアルコール、ブ 的、無痛化剤等を液控してもよい。

【0021】更に本発明アポトーシス誘導剤中には必要 こ応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他 の医薬品を含有せしめてもよい。

マチ(RA)等の酵原肉、漬瘡性大腸炎、シェーグレン 【0022】かくして得られる本発明のアポトーシス勝 導句は、アポトーシス酰導作用に基づいて、アポトーシ スの過剰抑制に起因する各種疾患に適用でき、所質の薬 AIDS, ARC (AIDS隔準疾題)、ATL (成人 T 超均白血病:Adult T-cellleukemin)、毛梭細胞性白 血病 (Hairy cell leukemia)、脊柱症 (HAM/TSP)、呼 (HAU) 等のHTLV-1隔速疾患、自己免疫疾患、例 えばSLE (全身性エリテマトーデス)、慢性関節リウ 症候群、原発性胆汁性肝硬变、突発性血小板减少性紫斑 理効果を期待できる。 該適用疾患としては、例えば痛、 双路障曹(HAB/HABA)、関節症(HAAP)、プドウ殿炎

症、子宫筋髓、気管支喘息、動脈硬化症、各種先天性奇形症、腎炎、老人性白内障、慢性疲労症候群(Chronic リン依存型(1型)糖尿病等を例示できる。また、本発 明のアポトーシス誘導剤は、骨髄異形成症候群、周期性 C型、A型、B型、F型等の各種の肝炎、アルツハイマ ー係、アルツハイマー型老年超呆症、心筋炎、ARDS (成人呼吸急迫症候群)、感染症、肝硬変、前立腺肥大 Faligiu Syndrome)、筋ジストロフィー(Myolonic dys 自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、橋本病、インス 爾 (Idiopathic Thrombocytopenic Purapura: ITP) 、 卣小板减少症、再生不良性貧血、突発性血小板减少症、 凡発性血質内凝固症等の血小板減少を伴う各種の疾患、 Irophy)等の各種疾患にも適応可能である。

4 O 珀地(Life Technologies社製)にペニシリンG(I

r)、TNF-α及びIL-4は、いずれも市販品 (Pepr

o Tech EC社製)を用いた。

[0026]

(granulocyte-macrophage colonystimulating facto

の化学療法剤として知られている各種の制癌剤や放射線 【0023】特に、本発明アポトーシス誘導剤を制癌剤 として用いる場合、その投与により癌細胞に対してアポ トーシスを誘導でき、制癌作用を発揮するが、これを癌 き、副作用の軽減を図ることもできる。斯かる化学療法 協和発酵工業株式会社製)、マイトマイシン(Mitomyci 模製薬株式会社製)、トヨマイシン (Toyomicin. 武田 **削としては、例えば5-フルオロウラシル(5-FU、** n-C、同上社製)、フトラフール (FT-207、大助 療法と併用すれば、制癌効果を一層助長することがで 薬品工業株式会社製)、エンドキサン(Endoxan, 集品工業株式会社製)等が挙げられる。

[0024]

【英施例】以下に爽施例を挙げて、本発明を更に詳細に 説明する。 東 権 内 一

(1) 活動型慢性関節リウマチ患者の骨髄検体から、市 販キット (Histopaque:Sigma社製) を用いて、濃度勾配 +)を得た。分韓回収した細胞は、CD34+細胞が約 法により単核球を分離した。分離した単核球から磁気ビ 【0025】 (2) CD34+細胞を24ウエル平底マ ウエルになるようにSCF (10ng/ml) とGM-CSF ーズ (Dynal CD34 progenitor cells selection syste e: Dynal社製)を用いてCD34陽性細胞(CD34 イクロプレート (No.3596:Costar) に1. 0×10⁵/ 95%でCD19+B相間は0.5%以下でおった。

先期配中 (PI現在目記火) .. 2.06 £.03 2.0 1XF-a/1L-4 板吸试杆 羅女 1.VF-0 Ξ

[0021] 表1より、TNFーa及び1Lー4を併用 した本発明のアポトーシス誘導剤は、TNF-a又は1 1-4を単独で用いた場合に比べ、死細胞帯が相原的に 増強することが示された。

を用い、実施例1 (2) と同様にして、TNF-a及び Hela粗胞 (子宮頸部扁平上皮癌由来ヒト培養細胞) | L-4の併用効果を試験した。尚、Hela細胞は、 2×10*/ケエルにて96ケエングレートに拍響し た。結果を殺2に示す。 [0028] 実施例2

SF [被2] 死細胞率 (P!陽性細胞) (%) SCF/CN-CSF SCF/CM-CSF 1L-4 TNF- a / 1L-4 東野以外

[0029]

[0030] 表2より、TNFーa及び1 Lー4を併用

α又は1L-4を単独で用いた場合に比べ、アポトージ **【発明の効果】本発明アポトーシス結弾剤は、TNFー** ス誘導効果が钼乗的に増強され、制作用の少ない制格 [0031]

> した本発明のアポトーシス誘導剤は、TNF-a又は1 L-4を単独で用いた場合に比べ、死細胞率が相乗的に 増強することが示された。

€

汝、肝硬変等の肝疾患治療剤等として使用できる。

剤、慢性関節リウマチ治療剤、自己免疫疾患治療剤、肝

8

S